

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局
特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類6 C12N 15/12, C12P 21/02, C12Q 1/68, C07K 16/40		A1	(11) 国際公開番号 WO99/35261																																																							
			(43) 国際公開日 1999年7月15日(15.07.99)																																																							
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/00039</p> <p>(22) 国際出願日 1999年1月8日(08.01.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/13232 1998年1月8日(08.01.98) JP 特願平10/33584 1998年1月30日(30.01.98) JP 特願平10/139177 1998年5月6日(06.05.98) JP</p> <p>(71) 出願人(米国を除くすべての指定国について) 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA)[JP/JP] 〒115-8543 東京都北区浮間五丁目5番1号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者: および (75) 発明者/出願人(米国についてのみ) 土屋政幸(TSUCHIYA, Masayuki)[JP/JP] 吉田賢二(YOSHIDA, Kenji)[JP/JP] 〒412-8513 静岡県御殿場市駒門一丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 長谷川芳樹, 外(HASEGAWA, Yoshiki et al.) 〒104-0031 東京都中央区京橋二丁目13番10号 京橋ナショナルビル6F 創英國際特許事務所 Tokyo, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIP0特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ューラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>																																																								
<p>(54) Title: NOVEL GENE HAVING REVERSE TRANSCRIPTASE MOTIF</p> <p>(54) 発明の名称 逆転写酵素モチーフを有する新規遺伝子</p> <p>(57) Abstract A novel gene having a reverse transcriptase motif; the full base sequence of this gene isolated; a protein encoded by the gene; and an antibody against this protein. They are useful in developing a method for detecting telomerase activity, a method for detecting cancer cells, a telomerase activity inhibitor and a method for screening a telomerase activity inhibitor.</p>																																																										
<p>a テロメラーゼ活性と CRT-1 遺伝子発現の相關</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>PC33</th> <th>COLO205</th> <th>HCT-15</th> <th>DU145</th> <th>LNCAP</th> <th>PC5</th> <th>MCF7</th> <th>SCC</th> <th>WI-38</th> <th>Testis</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>b 細胞株</td> <td></td> </tr> <tr> <td>c テロメラーゼ活性</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>-</td> <td>+</td> <td></td> </tr> <tr> <td>CRT-1</td> <td colspan="10"></td> </tr> <tr> <td>GSPDH</td> <td colspan="10"></td> </tr> </tbody> </table> <p>a ... CORRELATION BETWEEN TELOMERASE ACTIVITY AND CRT-1 GENE EXPRESSION</p> <p>b ... CELL LINE</p> <p>c ... TELOMERASE ACTIVITY</p>					PC33	COLO205	HCT-15	DU145	LNCAP	PC5	MCF7	SCC	WI-38	Testis	b 細胞株											c テロメラーゼ活性	+	+	+	+	+	+	+	-	+		CRT-1											GSPDH										
	PC33	COLO205	HCT-15	DU145	LNCAP	PC5	MCF7	SCC	WI-38	Testis																																																
b 細胞株																																																										
c テロメラーゼ活性	+	+	+	+	+	+	+	-	+																																																	
CRT-1																																																										
GSPDH																																																										

(57)要約

本発明は、逆転写モチーフを有する新規な遺伝子を提供することを目的とする。本発明は、逆転写モチーフを有する新規遺伝子を単離してその決定された全塩基配列を与える。また、該遺伝子がコードするタンパク質、該タンパク質に対する抗体を提供する。それらを用いて、テロメラーゼ活性検出方法、癌細胞検出方法、さらにはテロメラーゼ活性阻害剤の開発あるいはテロメラーゼ活性阻害剤のスクリーニング方法の開発に有用である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	ES スペイン	LI リヒテンシュタイン	SG シンガポール
AL アルバニア	FI フィンランド	LK スリ・ランカ	SI スロヴェニア
AM アルメニア	FR フランス	LR リベリア	SK スロヴァキア
AT オーストリア	GA ガボン	LS レソト	SL シエラ・レオネ
AU オーストラリア	GB 英国	LT リトアニア	SN セネガル
AZ アゼルバイジャン	GD グレナダ	LU ルクセンブルグ	SZ スウェーデン
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE グルジア	LV ラトヴィア	TD チャード
BB バルバドス	GH ガーナ	MC モナコ	TG トーゴー
BE ベルギー	GM ガンビア	MD モルドavia	TJ タジキスタン
BF ブルキナ・ファン	GN ギニア	MG マダガスカル	TM トルクメニスタン
BG ブルガリア	GW ギニア・ビサオ	MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR トルコ
BI ベナン	GR ギリシャ	ML 共和国	TT トリニダッド・トバゴ
BR ブラジル	HR クロアチア	MN マリ	UA ウクライナ
BY ベラルーシ	HU ハンガリー	MR モンゴル	UG ウガンダ
CA カナダ	ID インドネシア	MR モーリタニア	US 米国
CF 中央アフリカ	IE アイルランド	MW マラウイ	UZ ウズベキスタン
CG コンゴー	IL イスラエル	MX メキシコ	VN ヴィエトナム
CH スイス	IN インド	NE ニジエール	YU ユーゴスラビア
CI コートジボアール	IS イスランド	NL オランダ	ZA 南アフリカ共和国
CM カメルーン	IT イタリア	NO ノルウェー	ZW ジンバブエ
CN 中国	JP 日本	NZ ニュー・ジーランド	
CU キューバ	KE ケニア	PL ポーランド	
CY キプロス	KG キルギスタン	PT ポルトガル	
CZ チェコ	KP 北朝鮮	RO ルーマニア	
DE ドイツ	KR 韓国	RU ロシア	
DK デンマーク	KZ カザフスタン	SD スーダン	
EE エストニア	LC セントルシア	SE スウェーデン	

明細書

逆転写酵素モチーフを有する新規遺伝子

技術分野

5 本発明は、逆転写酵素モチーフを有する新規遺伝子、該遺伝子がコードするタンパク質、該タンパク質に対する抗体、及びそれらを用いた逆転写酵素活性検出方法、癌細胞検出方法、さらに逆転写酵素活性阻害剤あるいは逆転写酵素活性阻害剤のスクリーニング方法に関する。

10 また、上記検出方法を用いた癌の診断方法、上記遺伝子に対して相補的なプローブを含有する癌診断薬、さらに上記抗体を含有する癌診断薬に関する。

背景技術

テロメラーゼは細胞分裂のたびに短縮するテロメア長を修復する機能を有する酵素であることが知られている (Greider C.W. and Blackburn E.H., (1987) 15 Cell, 51, 887-898 ; Morin G.B. (1989) Cell, 59, 521-529)。

また、ほとんどの癌細胞でテロメラーゼ活性が認められ (Kim N.W. et al., (1994) Science, 206, 2011-2015)、癌細胞の無限増殖の維持にテロメラーゼが関与することが強く示唆されている。

それ故、テロメラーゼ活性の測定は、癌の診断に重要であり、さらにテロメラーゼ活性を阻害する物質は、正常細胞に対する副作用の少ない抗癌剤として期待される (Counter C.M. et al., (1989) EMBO J., 11, 1921-1929; Counter C.M. et al., (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 2900-2904 ; Chadenneau C. et al., (1995) Cancer Res., 55, 2533-2536 ; Hiyama E. et al., (1995) 20 Nature Med., 1, 249-255 ; Shay J. W. et al., (1995) Mol. Cell. Biol., 25 15, 425-432)。

テロメラーゼ活性を測定する従来法の1つは、テロメラーゼ酵素活性を測定す

る方法である。

この方法は、酵素活性を維持した状態で細胞抽出物をあらかじめ調製する必要があり、その後、テロメア伸長反応（テロメラーゼ反応）を実施し、これを直接に、またはポリメラーゼ連鎖反応（PCR）にて増幅した後に、得られた DNA の量 5 を測定するものであり、簡便かつ効果的なテロメラーゼの活性測定ではなかった。

また、他のテロメラーゼ活性測定方法としては、テロメラーゼ遺伝子の発現を測定する方法であるが、係る方法は、テロメラーゼ活性と相関する遺伝子を同定することが必要となる。

最近このような遺伝子の 1 つとして、ヒト精巣由来あるいは癌細胞由来の 10 mRNA より、分子量約 130kDa の逆転写酵素モチーフを有する蛋白をコードする遺伝子が単離された (Meyerson M., et al., (1997) Cell, 90, 785-795; Nakamura T.M. et al., (1997) Science, 277, 955-959)。

またこの遺伝子の発現と、テロメラーゼ活性とがよい相関を示したことから、この遺伝子はヒトテロメラーゼ触媒サブユニットをコードするものと推察されて 15 いる。

しかしながら、テロメラーゼについては今も不明な点が多い。

例えば、逆転写酵素モチーフを有する遺伝子は複数個存在しないのか、テロメラーゼ活性を示す遺伝子は 1 個か複数個存在するのか、正常生殖細胞と癌細胞のテロメラーゼ活性は常に同一の遺伝子産物によるのか、すべての癌細胞のテロメラーゼ活性が单一の遺伝子で説明されるのかなど、これらの問題点の解決がテロメラーゼに着眼した癌の診断と治療において切望されている。

発明の開示

本発明は、逆転写酵素活性と相関を有する、逆転写酵素モチーフを有する蛋白 25 をコードする新規遺伝子を提供することを目的とする。

また、該遺伝子がコードするタンパク質、及びそのタンパク質に対する抗体を

提供することを目的とする。

さらに、上記遺伝子、タンパク質、抗体を用いた逆転写酵素活性測定方法、癌細胞検出方法を提供することを目的とする。

ここで逆転写酵素とは、RNA を録型にして DNA 合成を行う核酸ポリメラーゼの一般的な総称であり、代表的なものにレトロウイルスの逆転写酵素が知られている。

テロメラーゼは、自身のサブユニットである 1 本鎖 RNA を録型としてテロメア DNA 配列を合成することから、RNA 依存性 DNA ポリメラーゼの仲間、すなわち逆転写酵素の仲間として位置付けられているものである。

10 なお、本明細書中で逆転写酵素活性とは好ましくはテロメラーゼ酵素活性を意味する。

図面の簡単な説明

図 1 は、テロメラーゼ活性と、C R T - 1 遺伝子発現の相関を示す電気泳動写真である。ここで PC93, COLO203, HCT-15, DU145, LNCap, PC3, MCF7, SC6, HL60, WI-38 とはそれぞれ、前立腺癌、大腸癌、大腸癌、前立腺癌、前立腺癌、前立腺癌、乳癌、胃癌、前骨髄性白血病細胞、及び肺由来の細胞株を示し、また testis は精巣（組織）を示す。

20 発明を実施するための最良の形態

本発明者は、上記問題点に鑑み、逆転写酵素活性と相関を有する新規遺伝子を発見すべく鋭意研究を重ねた結果、ヒト前骨髄性白血病細胞株 HL60 細胞より逆転写酵素モチーフを有する蛋白をコードする新規遺伝子を見出し、さらに得られた遺伝子の発現と逆転写酵素活性に相関があることを確認し、本発明を完成する

25 に至った。

従って、本発明に係る遺伝子および該遺伝子がコードする蛋白質、又は該タン

パク質に対する抗体を用いることにより逆転写酵素活性を測定可能とし、さらに、逆転写酵素活性の発現を制御可能とするものである。

さらに該活性の阻害剤のデザイン、又は逆転写酵素活性阻害剤のスクリーニング方法が開発可能となる。

5 より詳しくは、本発明は、以下の遺伝子、タンパク質、抗体、癌細胞検出方法、逆転写酵素活性阻害剤、そのスクリーニング方法、逆転写酵素活性調節剤、リボザイム、逆転写酵素活性抑制剤、逆転写酵素活性誘導剤スクリーニング方法、および逆転写酵素活性誘導剤を提供するものである。

1. 配列表の配列番号 1、9、11 に記載の塩基配列を有する CRT-1 遺伝子。
- 10 2. 配列表の配列番号 2、10、12 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子。
3. 配列表の配列番号 2、10、12 に記載のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ逆転写酵素活性を有するタンパク質をコードする遺伝子。
- 15 4. 上記 1.~3. のいずれか 1 つに記載の遺伝子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ逆転写酵素活性を有するタンパク質をコードする遺伝子。
5. 配列表の配列番号 2、10、12 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。
- 20 6. 配列表の配列番号 2、10、12 に記載のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ逆転写酵素活性を有するタンパク質。
7. 上記 5. 又は 6. のいずれか 1 つに記載のタンパク質に対する抗体。
8. 上記 1.~4. のいずれか 1 つに記載の遺伝子のアンチセンス鎖の塩基配列
- 25 を含むオリゴヌクレオチド。
9. 上記 1.~4. に記載の遺伝子を検出することを特徴とする癌細胞検出方法。

10. 上記 7.に記載のタンパク質に対する抗体を用いることを特徴とする癌細胞検出方法。
11. 上記 1.~4.のいずれか 1 つに記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドを有する逆転写酵素活性阻害剤。
- 5 12. 上記 1.~4.のいずれか 1 つに記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドを用いる逆転写酵素活性阻害剤のスクリーニング方法。
13. 上記 1.~4.のいずれかに記載の遺伝子を検出することを特徴とする癌細胞検出方法。
14. 上記 1.~4.のいずれかに記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドを有する逆転写酵素活性阻害剤。
- 10 15. 上記 1.~4.のいずれかに記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドを用いる逆転写酵素活性阻害剤のスクリーニング方法。
16. 上記 CRT-1 遺伝子に作用して逆転写酵素活性を調節する薬剤。
17. 上記 CRT-1 遺伝子のリボザイム。
- 15 18. 上記 CRT-1 タンパク質に対する細胞内抗体。
19. 上記 CRT-1 タンパク質のドミナントネガティブタンパク質を含有する逆転写酵素活性抑制剤。
20. 上記 CRT-1 タンパク質、または該遺伝子を用いて逆転写酵素活性誘導剤をスクリーニングする方法。
- 20 21. 上記 CRT-1 遺伝子、タンパク質それらの変異体を含む逆転写酵素活性誘導体。
22. 上記癌細胞検出方法を用いた癌の診断方法。
23. 上記遺伝子に対して相補的なプローブを含有する癌診断薬。
24. 上記抗体を含有する癌診断薬。
- 25 以下に本発明を発明の実施の形態に即してさらに詳しく説明する。

ここで、遺伝子については、天然に存在するmRNAからの逆転写により得た

DNA（該DNAを増幅して得られるDNAを含む）を表す場合、その意味を明確するときはcDNAと称する。

（逆転写酵素モチーフを有する遺伝子）

本発明に係る逆転写酵素モチーフを有する遺伝子は、以下の操作により得るこ
5 とが可能である。

(1)ヒト由来の細胞からmRNAを調製する。

具体的にはHL-60が好ましく使用可能である。

(2)選択された細胞から、全RNAを調製する。

係る全RNA構成についても通常公知の方法が好ましく使用可能である。

10 (3)次に、poly(A)+RNA(mRNA)を調製する。

係る調製法にも特に制限はなく通常公知の方法、市販キットを用いて行うこと
が可能である。

(4)得られたmRNAに基づいて、5'RACE及び3'RACEに用いるHL-60のcDNAライ
15 ブラリーを調製する。

係る調製法にも特に制限はなく通常公知の方法、市販キットを用いて行うこと
が可能である。

(5)5'RACE法に用いるプライマーの選択には特に制限はないが、例えば纖毛虫
Euplotesおよび酵母S. cerevisiaeのテロメラーゼ触媒サブユニットに高いホ
モロジーをもつヒト由来のESTクローン(GenBank Accession Number AA281296)

20 をもとに、逆転写酵素様のモチーフをもつ遺伝子の5領域を増幅するプライマー
をデザインすることが可能である。

具体的には以下の実施例で使用したものが挙げられる。

また、プライマーの合成は通常の方法により望ましい純度で得ることが可能で
ある。

25 (6)遺伝子増幅条件についても特に制限はないが、通常公知の方法により最適
な増幅条件を選択することが可能である。

また、市販のキットを用いることも可能である。

増幅条件について具体的には、以下の実施例で使用した条件が挙げられる。

(7)得られた反応産物を精製した後、これを適当なベクターにサブクローニングし、クローニングされた遺伝子断片の塩基配列を決定する。

5 この際使用可能なサブクローニングベクターについては特に制限はないが、具体的には以下の実施例で使用したベクターが好ましい。

また市販キットも使用可能である。

塩基配列の決定方法についても特に制限はなく通常公知の方法、及びそれを利用したシーケンサーを使用可能である（例えば、Taq サイクルシークエンシング法（『Biotechniques, vol.7』（1989年）494～499頁に記載の方法）。

(8)3'RACE 法用のプライマーも上記 5'RACE 用のプライマーデザイン同様に行うことが可能である。

具体的には、実施例で使用した配列が挙げられる。

增幅反応条件についても上記 5'RACE 方法と同様に最適条件を選択することが可能である。

具体的には以下の実施例で使用した条件が挙げられる。

この際市販のキットを使用することも可能である。

(9)同様に反応産物を精製し、適当なベクターにサブクローニングし、その塩基配列を決定する。

20 (10)全長遺伝子の取得は、上記説明した 5'RACE 及び 3'RACE 法により得られた遺伝子断片から cDNA の 5' 末端及び 3' 末端にハイブリダイズするプライマーをデザインして適当な増幅反応により取得することが可能である。

係る増幅反応として実施例で使用した RT-PCR が好ましく使用可能である。

得られる遺伝子の塩基配列の決定方法についても特に制限はなく通常公知の方法、及びそれを利用したシーケンサーを使用可能である。

(組織分布の検出及び、癌細胞検出方法、抗癌剤スクリーニング方法)

上記得られた遺伝子の断片を用いてプローブを調製し、該遺伝子が発現している組織を見いだすことが可能である。

例えば前記プローブを通常公知の標識手段により標識し、公知のノーザンプロット法により実施することが可能である。

5 また、特定の標準物を用いることにより、特定の組織に発現している遺伝子を定量することも可能となる。

従って、該遺伝子の発現を検出することにより、テロメラーゼ活性を確認することが可能となる。

また、テロメラーゼ活性が癌細胞の存在と関連する場合には、係る遺伝子を検10 出定量することは癌細胞の検出方法を提供することになる。

同様に、上記遺伝子の発現の定量化により、抗癌剤の効果を確認する方法をも提供するものである。

この場合、抗癌剤の投与の有無、または抗癌剤の投与後の特定の時間内の遺伝子発現量の変化を確認することで可能となる。

15 (タンパク質、癌細胞検出方法)

上記の方法により、本発明に係るヒト由来の新規の逆転写酵素モチーフを有する遺伝子を取得し、係る遺伝子の塩基配列情報からその遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列を同定することが可能となる。

すなわち、本発明に係る新規遺伝子によりコードされるタンパク質は、配列表20 の配列番号3に記載のアミノ酸配列を含むタンパク質である。

また、本発明に係るタンパク質は、このアミノ酸配列のみに限定されることはなく、その1又は2以上のアミノ酸を置換し、欠失又は付加したものであって、かつテロメラーゼ活性を有するもの（変異体タンパク質）が含まれる。

従って、本発明に係るテロメラーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリ25 ヌクレオチドの具体例としては、配列表の配列番号の1に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドのみならず、自然、又は人工の変異によりポリヌクレオチド

の構造の一部を、該ポリヌクレオチドがコードするペプチドの主たる機能であるテロメラーゼ活性に変化を与えることなく変化させたもの（変異体遺伝子）も含まれる。

係る人工変異の導入方法には、例えば「Molecular Cloning 2nd Edition」
5 (Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989年)15.1~15.113頁を参照)が参考となる。

また、遺伝暗号の縮重により、該遺伝子の塩基配列の少なくとも一部の塩基を他の種類の塩基に置換して得られる遺伝子によっても同一のアミノ酸配列を有するタンパク質を得ることができる。

10 したがって、本発明に係るタンパク質をコードする遺伝子とは、本発明に係るタンパク質及びその変異体タンパク質をコードしうる全ての縮重のパターンを含むものである。

本発明に係るタンパク質（変異体タンパク質も含む）を得る方法は特に制限はない。

15 具体的には、蛋白合成装置等による人工的なペプチド合成方法、または本発明で得られた該タンパク質をコードする遺伝子の塩基配列情報に基づいて遺伝子工学的方法によりタンパク質を発現させる種々の方法が挙げられる。

この際 CRT-1 タンパク質は単独でもまた MBP(Maltose Binding Protein)等との融合タンパク質として発現してもよいし、FLAG ペプチドのような Tag を付加
20 して発現させてもよい。

また遺伝子工学的方法は、大腸菌などの細菌によって、あるいは酵母によってあるいは動物細胞や昆虫細胞を用いて調製することを可能とするものである。

具体例として、適当なベクター及び宿主を選択し、遺伝子を導入して形質転換体を得る方法が挙げられる（例えば、「細胞工学プロトコール」（秀潤社、1991年)105~107頁に記載の方法により可能である）。

さらに、得られた形質転換体を培養し、遺伝子の増幅、発現を行い目的タンパ

ク質を発現させることが可能である。

次に培養物を回収し、必要に応じて濃縮、可溶化、透析、各種クロマトグラフィー等の操作を行うことにより、本発明のタンパク質及びその変異体タンパク質を得ることが可能である。

5 形質転換体の培養については、各種の教科書があり、例えば、「微生物実験法」（社団法人日本生化学会編、東京化学同人、1992年）に記載の方法で行うことが可能である。

本発明に記載の塩基配列に基づいて目的とするタンパク質（変異体タンパク質を含む）を発現させることも、公知の方法により可能である。

10 このとき、宿主としては、大腸菌等の細菌、酵母、動物細胞のいずれも使用可能であるが、特には動物細胞が好ましい。

細胞に遺伝子を導入するには、リボソーム法、エレクトロポーレーション法等を用いることができる。

特に、D E A E - デキストラン法（ファルマシア社製）を用いることが好ましい。

得られた培養物からタンパク質を精製する精製方法には、免疫沈降法、塩析法、限外濾過法、等電点沈澱法、ゲル濾過法、電気泳動法、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィーや抗体クロマトグラフィー等の各種アフィニティークロマトグラフィー、クロマトフォーカシング法、吸着クロマトグラフィー法及び逆相クロマトグラフィー等があり、適宜選択して行えばよい。

また、製造段階において、製造する目的タンパク質は、他のポリペプチドとの融合ペプチドとして形質転換体に生産させてもよい。

必要に応じて、精製工程において、プロムシアン等の化学物質やプロテアーゼ等の酵素で処理して、該目的タンパク質を切り出す操作を行えばよい。

25 (抗体、抗体を用いた癌細胞検出方法)

上記得られるタンパク質（変異体タンパク質を含む）の全部又は一部のタンパ

ク質に対する抗体を得る方法は、通常公知の方法により可能である。

また、本発明に係る抗体とは、本発明のタンパク質（その変異体）と反応する限り、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体のいずれも含むものである。

また、その活性フラグメント及びその活性フラグメントを含むキメラ抗体も含まれる。

抗体、すなわち免疫グロブリンは、H鎖とL鎖を持ち、物理化学的性質や免疫学的性質から5つのクラス（IgA、IgD、IgE、IgG、IgM）に分けられる。

このうち、IgA、IgGはH鎖のタイプによってさらにサブクラスに分けられる。

本発明の新規抗体は、これらの全てのクラス、サブクラスに属するものを含む。

さらに、本発明の抗体は、必ずしも抗体分子全体を用いる必要はなく、活性を有する限り、分子の一部（活性フラグメント）を用いることができる。

活性フラグメントとしては、具体的には $F(ab')_2$ 、 Fab' 、 Fab 、 Fv 、組み換え Fv 体及び一本鎖 Fv を挙げることができる。

例えば、ペプシンで分解すると $F(ab')_2$ 、 Fc' が得られ、パパインで分解すると Fab 、 Fc が得られる。

これらの活性フラグメントは、単独でも用いられるが、必要に応じて、アルブミン、ポリエチレングリコール等の物質と結合させ、新たな複合物として用いることができる。

このような複合物は、一般に、生体内では、長時間分解されずにその効果を最大限まで発揮することが多い。

活性フラグメントに、アルブミン、ポリエチレングリコール等の物質を付加する方法は、例えば、『Antibodies, A Laboratory Manual』(Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)p.77-81, p129-137に記載されている。

一般的には、SPDP（ファルマシア社製）、SMPB（ピアス社製）、EMCS（ドータイト社製）等の2価反応性試薬を用いれば、活性フラグメントをアルブミン等と容易に結合させることができる。

本発明の抗体作成方法としては、例えば、「免疫実験操作法」（日本免疫学会編、日本免疫学会発行）を参考にすることができる。

免疫抗原としては本発明のタンパク質の一部、すなわち配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列、又は変異体タンパク質のアミノ酸配列のうちの連続する8
5 個以上のアミノ酸からなるポリペプチドであればよい。

また、それが抗体の作製に使用しうる精製度のものであれば、該タンパク質が得られた方法は問わない。

また、免疫抗原が、8ないし約20個のアミノ酸からなるポリペプチドである場合には、それをキーホールリンベットヘモシアニン（KLH）等のキャリアと
10 結合させて抗原として使用すればよい。

該免疫抗原を免疫する動物はヒト以外のいずれでもよく、通常当業者で使用される動物から目的の抗体を產生し得る動物種を選択して使用することが好ましい。

ポリクローナル抗体は、得られた抗血清を精製することによって得られる。

精製は、塩析、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティーコロマトグラ
15 フィー等の方法を組み合わせて行えばよい。

モノクローナル抗体は、通常のハイブリドーマを作製する方法によって融合細胞を得た後、該細胞に抗体を產生させることにより得られる。

細胞融合には、ポリエチレングリコール、センダイウイルス、電気パルス等を用いる手法が使用可能である。

20 また、上記以外に、遺伝子工学的な方法を用いても該モノクローナル抗体が得られる。

例えば、本発明のタンパク質又はその一部で免疫した動物の脾細胞、リンパ球又は該モノクローナル抗体を產生するハイブリドーマからmRNAを採取し、これをもとにcDNAライブラリーを作製する。

25 次に、該cDNAライブラリーにより抗体を発現させる。

抗原と反応する抗体を產生するクローンをスクリーニングによりcDNAライ

ブラリーから得、得られたクローンを培養し、培養混合物から目的とする抗体を、塩析、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティーコロマトグラフィー等の方法を組み合わせて精製することができる。

上記得られる本発明の抗体は、種々の組織に存在するテロメラーゼの検出に用
5 いることができる。

係る際には通常使用されるウエスタンブロッティング方法が好ましく使用可能である。

本発明のタンパク質、その変異体又はそれらの一部を精製するために使用する抗体カラムの作製、各分画中の該タンパク質、その変異体又はその一部の検出の
10 ために用いることができる。

さらに、特定の標準物を用いることにより、特定の組織に発現しているテロメラーゼを定量することも可能となる。

従って、該テロメラーゼの発現を検出することにより、テロメラーゼ活性を確認することが可能となる。

15 また、テロメラーゼ活性が癌細胞の存在と関連する場合には、係るテロメラーゼを検出定量することは癌細胞の検出方法を提供することになる。

同様に、上記テロメラーゼの発現の定量化により、抗癌剤の効果を確認する方法をも提供するものである。

この場合、抗癌剤の投与の有無、または抗癌剤の投与後の特定の時間内のテロ
20 メラーゼ発現量の変化を確認することで可能となる。

さらに、診断への応用として、例えば細胞の抽出液や病理組織を材料として、本発明の遺伝子が存在するかどうか調べることにより癌の診断が可能である。

具体的には、該遺伝子に対して相補的な配列をプローブとして用い、該遺伝子の有無を調べる方法がある。

25 その際にプローブとして用いられる配列の長さは 10base～1300base、好ましくは 10base～1000base、更に好ましくは 20base～400base である。

該遺伝子の有無を調べる際には該遺伝子を増幅させてもさせなくてもよいが、増幅させる手段としては RT-PCR 法、TMA(Transcription Mediated Amplification、特表平 4-500759 号) 法などを用いることが可能である。

検出手段としては HPA(Hybridization Protection Assay, 特表平 2-5043147) 5 法などを用いることが可能である。

癌の診断方法の具体例としては、例えば特表平 9-502102 号や米国特許 5489508 号に記載の方法を用いることができる。

特に用いる材料が病理組織の場合には、例えば上記プローブを用いた *in situ* hybridization 法を用いることができる。

10 また本発明に係わる抗体を用いた A B C 組織染色法を用いることができる。

(アンチセンスオリゴヌクレオチド、テロメラーゼ活性阻害剤、テロメラーゼ活性阻害剤スクリーニング方法)

本発明にて得られる上記遺伝子に基づくアンチセンスポリヌクレオチドには、塩基、リン酸、糖からなるヌクレオチドが複数結合したものが、天然には存在しないものを含めて全て含まれる。

その代表的なものは、DNA と mRNA である。

また、本発明のアンチセンスポリヌクレオチド誘導体には、その立体構造や機能がポリヌクレオチドと類似するものが全て含まれる。

20 例えば、ポリヌクレオチドの 3' 末端もしくは 5' 末端に他の物質が結合したものやポリヌクレオチドの塩基、糖、リン酸の少なくともいずれか一部において、置換や欠失や付加の修飾が生じた物質、天然に存在しないような塩基、糖、リン酸を有するものや、糖-リン酸骨格以外の骨格を有するものである。

該アンチセンスポリヌクレオチド及びその誘導体は、本発明に係る遺伝子及びその変異体遺伝子のいかなる部分にハイブリダイズするものであってもよい。

25 また、該アンチセンスポリヌクレオチド及びその誘導体は、組織や細胞における本発明に係るタンパク質又はその変異体をコードする遺伝子の存在やその発現

状況を調べるための研究用ポリヌクレオチドプローブとして、使用可能である。

また、診断用ポリヌクレオチドプローブとしても使用可能である。

なお、プローブとしては、12塩基以上且つGC含有率が30ないし70%であるものが好ましく、16塩基以上且つGC含有率が30ないし70%であるものが、特に好ましい。

また、該アンチセンスポリヌクレオチド及びその誘導体を使用して、本発明に係るタンパク質（その変異体を含む）の発現を調節することが可能である。

これらは上記タンパク質をコードする遺伝子もしくはmRNAにハイブリダイズして係るタンパク質の発現を抑制することが期待されるので、係るタンパク質が関与する機能、すなわちテロメラーゼ活性に基づく癌等の疾患の治療薬として使用可能である。

すなわち、該アンチセンスポリヌクレオチドやその誘導体よりアンチセンス医薬品を開発することが可能である。

一般に、ポリペプチドをコードするDNAやmRNAの相補的な塩基配列を含むポリヌクレオチドを使用して、該ポリペプチドの発現を調節する方法は、アンチセンス法と呼ばれている。

相補的な配列を有するポリヌクレオチドは、①遺伝子からpre-mRNAへの転写段階、②pre-mRNAから成熟mRNAへのプロセッシング段階、③核膜通過段階、④蛋白への翻訳段階のいずれかで、遺伝情報を担うDNA又はmRNAに結合し、遺伝情報の伝達の正常な流れに影響を与えてポリペプチドの発現を調節すると考えられている。

一般的には、15塩基以上の塩基を含む塩基配列であれば特異性のある配列であると考えられている（横山一成、蛋白質・核酸・酵素、38巻、754～765頁、1994年）。

従って、本発明のアンチセンスポリヌクレオチド及びアンチセンスポリヌクレオチド誘導体も、本発明に係るタンパク質及びその変異体に対するmRNAに相

補的な塩基配列であって 15 塩基以上からなる塩基配列を含むものであれば、本発明に係る遺伝子もしくは本発明に係る遺伝子に対するmRNAに特異的に結合することが推定される。

一方、ポリヌクレオチドを細胞内に取り込ませるには、その長さはあまりに長すぎても不適当である。

本発明のアンチセンスポリヌクレオチド及びその誘導体は、いかなる長さのものであってもよいが、本発明のアンチセンスポリヌクレオチドおよびアンチセンスポリヌクレオチド誘導体を細胞内に取り込ませ、タンパク質の発現を調節させることを考慮すると、前記アンチセンスポリヌクレオチド及びこれらアンチセンスポリヌクレオチドの誘導体は遺伝子に対するmRNAに相補的な 15 塩基以上 30 塩基以下、好ましくは 15 塩基以上 25 塩基以下、より好ましくは 18 塩基以上 22 塩基以下の塩基数から成る塩基配列を有するものが好ましい。

本発明のアンチセンスポリヌクレオチド及びアンチセンスヌクレオチド誘導体においても、公知のアンチセンス技術を用いて、ポリヌクレオチドの医薬品としての効果を高めることを目的として様々な誘導体、即ち、目的のDNAやmRNAとの結合力、組織選択性、細胞透過性、ヌクレアーゼ耐性、細胞内安定性の高い様々なポリヌクレオチド誘導体が得られうる。

ハイブリダイズのし易さの点では、一般的には、ステムループを形成している領域の塩基配列に相補的な塩基配列を持つポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体を設計するとよいとされている（『臨床免疫 25巻』1200～1206 頁、1993 年）。

本発明のポリヌクレオチド及びその誘導体は、必要に応じ、ステムループを形成することが可能である。

また、翻訳開始コドン付近、リボソーム結合部位、キャッピング部位、スライス部位の配列に相補的な配列を有するようなポリヌクレオチドは、一般に高い発現抑制効果が期待できる（『癌と化学療法 20巻 13号』1899～1907 頁）。

したがって、本発明のポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体であって、本発明に係るタンパク質又はその変異体をコードする遺伝子又は該遺伝子に対するmRNAの翻訳開始コドン付近、リボソーム結合部位、キャッピング部位、スプライス部位の相補的な配列を含むものは、高い発現抑制効果が期待される。

5 現在一般に知られている誘導体は、ヌクレアーゼ耐性、組織選択性、細胞透過性、結合力の少なくとも1つが高められた誘導体であることが好ましく、特に好ましくは、当該ポリヌクレオチド誘導体は、フォスフォロチオエート結合（「癌と化学療法」20巻、13号、1899-1907頁、1993年参照）を骨格構造として有する誘導体であることが示されている。

10 本発明のポリヌクレオチド及びその誘導体についても、これらの機能又は構造を有する誘導体が含まれる。

本発明のアンチセンスポリヌクレオチド誘導体の製造方法については、例えば、『Antisense Research and Applications』（Michael J. GAIT, p290-299, CRC出版、フロリダ、1993年）に記載の方法を用いることが可能である。

15 例えば、天然型のDNAやRNAであれば、化学合成機を使用して合成したり、本発明に係るタンパク質をコードする遺伝子を鋳型とするPCR法により本発明のアンチセンスポリヌクレオチドを得ることができる。

また、メチルフォスフォネート型やフォスフォロチオエート型等、誘導体の中には、化学合成機（例えば、パーキンエルマージャパン社製394型）を使用して合成できるものもある。

この場合には、化学合成機に添付されている説明書にしたがって操作を行い、得られた合成産物を逆相クロマトグラフィー等を用いたHPLC法により精製することによっても、目的のポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド誘導体を得ることができる。

25 (応用例)

上で一般的に説明したように、本発明に係る遺伝子及びそれがコードするタン

パク質、また、それらの変異体の全部又は一部を利用して、遺伝子治療、その他の種々の応用が可能となるが、以下にその具体的応用例のいくつかを詳細に説明する。

(1) 遺伝子治療への適応例

5 本発明に係るアンチセンス RNA を細胞内で発現させることにより CRT-1 タンパク質の翻訳を阻害することができる。

係る目的のために、適当な動物細胞用の発現ベクターに、pCRT-1 の全長または cDNA の一部分を逆方向にクローニング部位に挿入することで、適当なプロモーターによりアンチセンス RNA を調製することができる。

10 また、pCRT-1 タンパク質の活性を抑制する細胞内抗体に適用可能である。

具体的にはすでに報告されているように HIV 治療法(Marasco W.A. Gene Therapy (1997) 4, 11-15.)、または乳癌治療法(Wright M., et al., Gene Therapy (1997) 4, 317-322.)が挙げられる。

15 CRT-1 に対するモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ法や抗体ライブラリー法により単離することができる。

CRT-1 の活性を抑制できるモノクローナル抗体を選択した後、ハイブリドーマ細胞より抗体の可変領域をコードする cDNA を単離することができる。

細胞内抗体は、1本鎖抗体の構築に基づいて構築できる。

20 すなわち、H鎖及びL鎖可変領域をリンカー配列、例えば 15 アミノ酸配列(Gly4Ser)3 によって連結し、これを適当な発現ベクターによって細胞内で発現させることができる。

また、CRT-1 の変異体をドミナントネガティブとして細胞内で発現させることで、CRT-1 の活性を抑制することが可能となる。

25 ドミナントネガティブは、例えばテロメア配列に結合するが DNA 合成能力が欠損している変異体に基づいて構築される。

ドミナントネガティブは、正常の CRT-1 に対しきっこう阻害を示す。

また、CRT-1 の mRNA を特異的に分解できるリボザイムを細胞に導入して CRT-1 を阻害することも可能である。

ここで、リボザイムは配列特異的に RNA 切断活性を有する RNA 分子であり、癌や HIV の遺伝子治療法として知られている(Looney D. and Yu M., Methods in Molecular Biology (1997) 74, 469-486; Duarte E.A., et al., Methods in Molecular Biology (1997) 74, 459-468)。

(2) CRT-1 と相互作用する細胞内因子の同定に用いることが可能である。

テトラヒメナや酵母のテロメラーゼの研究から、細胞内のテロメラーゼは複数のタンパク因子と複合体を形成していることが示唆されている (Collins K., et al., Cell (1995) 81, 677-686; Linger J., et al., Science (1997) 276, 561-567)。

CRT-1 と相互作用する因子は例えば酵母を用いた公知技術である Two-hybrid 法で単離することが可能である(Cowell I.G. Method in Molecular Biology (1997) 69, 185-202)。

(3) CRT-1 タンパク質は、結晶化して構造解析の研究材料として提供可能であり、また薬物設計にもちいることも可能である。

さらに、テロメラーゼ活性を有する酵素系を再構成する材料として用いることも可能である。

係る再構成系はテロメラーゼ活性を調節する物質の探索に用いることが可能である。

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されない。

(実施例 1)

cDNA クローニング

(1) HL-60 mRNA の調製および cDNA ライブライリの作製

HL-60 株より、Chirgwin ら(1979)の方法(Biochemistry 18, 5294-5299)に従

い全 RNA を調製し、mRNA Purification Kit (Pharmacia 社製)を用いて製造者の指示に従い poly A+RNA を調製した。

5' RACE 及び 3' RACE 用 HL-60cDNA ライブライアリを Marathon™ cDNA Amplification Kit(CLONTECH 社製)を用いて製造者の指示に従い作製した。

5 (2) 5' RACE 法

纖毛虫 *Euplotes* および酵母 *S. cerevisiae* のテロメラーゼ触媒サブユニットに高いホモロジーをもつヒト由来の EST クローン(GenBank Accession Number AA281296)をもとに、逆転写酵素様のモチーフをもつ遺伝子の 5' 領域を増幅するプライマー-hTRT5(配列 : 5'-ccgctcgtagttgagcacgctgaa-3') および telo-rev (配列 : 5'-accctcttcaagtgctgtc-3') をデザインした。

これらのプライマーは(株) サワディー・テクノロジーより得た(以下用いるプライマーも同様)。

Takara LA PCRTM Kit Ver.2(宝酒造社製)を用い、以下の条件で遺伝子増幅を行った。

15 反応液(50 μl)を、1xLA PCR Buffer II (Mg^{2+})、0.2 mM dNTP、0.2 μM の hTRT5 プライマーおよび AP1 プライマー(Marathon™ cDNA Amplification Kit に付属), 2 μl の 5' RACE 用 cDNA ライブライアリ、並びに 5U Takara LA Taq からなる組成になるように調製し、Perkin-Elmer/ABI 社製の GeneAmp PCR System 2400 を用いて 94°C 1min, 30 サイクルの 94°C 15 sec と 68°C 3min, 68°C 7min の条件 20 で反応させた。

この反応産物を 50 倍希釈したもの 1 μl を鋳型に 0.2 μM の telo-rev プライマーと AP2 プライマー(Marathon™ cDNA Amplification Kit に付属)を用いて 94°C 1min, 15 サイクルの 94°C 15 sec と 68°C 3min, 68°C 7min の条件で反応を行った。

25 なお、プライマーと鋳型 DNA 以外の反応液組成ははじめの反応液と同様である。 2 段階目の反応産物を PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて精製し、こ

れを pGEM-T ベクター(Promega)にサブクローニングし、その塩基配列を AmpliTaq FS Prism ready reaction cycle sequencing Kit (Perkin-Elmer/ABI 社製)を用いて決定した。

その結果逆転写様モチーフを有する遺伝子を同定した。

5 単離した配列の 3' 末端 213 bp は、以前逆転写様モチーフをもつ遺伝子として単離された hEST2/hTRT1 (Meyerson M. et al. (1997) Cell 90, 785-795; Nakamura T. M. et al. (1997) Science 277, 955-959) と同一の配列をもつが、3' 末端側から 214bp より上流は全く異なる構造をもっていた。

(3) 3' RACE 法

10 5' RACE 法により得られた 5 断片の配列をもとに 3' RACE 用のプライマー hRT1 (配列 : 5' -tgcgtttcctgccgagtgtgtgtatcc-3') と hRT3 (配列 : 5' -tgcacagatgaagatgtggagactcacgag-3') 及び telo-for (配列 : 5' -agttcctgcactggctgatgagtg-3') をデザインした。

3' RACE を 5' RACE 同様、以下の条件で行った。

15 Takara LA PCRTM Kit Ver.2 を用い、以下の条件で遺伝子增幅を行った。

反応液(50 μ l)を、1x LA PCR Buffer II (Mg^{2+}), 0.2 mM dNTP, 0.2 μ M の hRT1 もしくは hRT3 プライマーおよび AP1 プライマー, 2 μ l の 3' RACE 用 cDNA ライブライアリ、並びに 5 U Takara LA Taq からなる組成になるように調製し、94°C 1min, 30 サイクルの 94°C 15 sec と 68°C 3min, 68°C 7min の条件で反応

20 させた。

この反応産物を 50 倍希釈したもの 1 μ l を鋳型に 0.2 μ M の telo-for プライマーと AP2 プライマーを用いて 94°C 1min, 15 サイクルの 94°C 15 sec と 68°C 3min, 68°C 7min の条件で反応を行った。

なお、プライマーと鋳型 DNA 以外の反応液組成ははじめの反応液と同様である。

25 2 段階目の反応産物を PCR Purification Kit を用いて精製し、これを pGEM-T ベクターにサブクローニングし、その塩基配列を AmpliTaq FS Prism ready

reaction cycle sequencing Kit を用いて決定した。

(4) RT-PCR によるアミノ酸をコードする領域の遺伝子の取得

3'-RACE 法により得られた遺伝子断片から cDNA の 3' 末端にハイブリダイズするプライマーとして、プライマー hCRT-rev (配列 : 5' -

5 aagatgaagtctcactctgttgcggcaggctggagt-3') と、プライマー hCRT-rev2 (配列 : 5' -ctgaaaaact catatattca gtatttact cccacag-3') をデザインし、これらのプライマーと hRT3 を用いて RACE 用 cDNA ライブライアリを錠型にアミノ酸をコードする領域を含む遺伝子を PCR 法により取得した。

反応条件は以下の通りである。

10 1x LA PCR Buffer II (Mg^{2+}), 0.2 mM dNTP, 0.2 μ M hCRT-rev プライマー (若しくは hCRT-rev2 プライマー) 及び hRT3 プライマー, 2 μ l の RACE 用 cDNA ライブライアリ、並びに 5U Takara LA Taq からなるように反応液 50 μ l を調製し、Perkin-Elmer/ABI 社製の GeneAmp PCR System 2400 を用いて 94°C 1min, 30 サイクルの 94°C 15 sec と 68°C 3min, 68 °C 7min の条件で反応させた。

15 得られた反応産物を pGEM-T ベクターにサブクローニングしその塩基配列を AmpliTaq FS Prism ready reaction cycle sequencing Kit (Perkin-Elmer/ABI 社製) を用いて決定した。

数種のスプライシングバリエントを取得し、その中から可能な逆転写様蛋白質の読み枠をもつ配列を推定した。

20 プライマー hCRT-rev を用いた場合に 2 種類の上記塩基配列が得られた。

その 1 の塩基配列、及び導かれるアミノ酸配列をそれぞれ配列表の配列番号 1 及び 2 に示した。

また、他の 1 つの塩基配列、及び導かれるアミノ酸配列をそれぞれ配列表の配列番号 9 及び 10 に示した。

25 また、プライマー hCRT-rev2 を用いた場合に得られた上記塩基配列、及び導かれるアミノ酸配列をそれぞれ配列表の配列番号 11 及び 12 に示した。

配列番号 10 のアミノ酸配列は、配列番号 2 のアミノ酸配列の 361 番目に Leu が挿入されたものであった。

また、配列番号 12 のアミノ酸配列は、配列番号 2 のアミノ酸配列の 361 番目に Leu が挿入され、437 番目の Arg が Ser に置換され、かつさらにアミノ酸残基 5 が付加されたものであった。

(実施例 2)

RT-PCR 法による遺伝子診断

1. 発現分布の解析

本発明に係る逆転写様モチーフを有する遺伝子 C R T - 1 を增幅するプライマー 10 (h R T 3 及び h T R T 5) を用いて、テロメラーゼ活性を保有する癌細胞株や 精巣及びテロメラーゼ活性を保持しない正常二倍体細胞株 W I - 3 8 での h C R T の発現を R T - P C R 法により調べた。

なお、R T - P C R は以下の手順で行った。

各種培養細胞より、グアニジン-イソチアネート／フェノール法(Chomczynski and Sacchi(1987) Anal. Biochem. 162, 156-159)に従い、全 R N A を調製し、First-Strand cDNA Synthesis Kit (Pharmacia)を用いて使用マニュアルに従い c D N A 合成を行った。

反応産物 1 / 5 0 を鋳型に用いて以下の条件で P C R を行った。

反応は 2 0 μ l スケールで行い、反応液組成を 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 20 1.5 mM MgCl₂, 0.2 μ M のプライマー hRT3 と hRT5 及び 1 U AmpliTaqGold(Perkin-Elmer)に調製した。

Perkin-Elmer/ABI 社製の GeneAmpPCR System 9600 を用いて、94°C 10 分、40 サイクルの 94°C 30 秒、55°C 30 秒、72°C 1 分の条件で反応させた。

反応産物を 1 % アガロース電気泳動により分析した。

25 癌細胞株や精巣において h C R T 遺伝子の発現が認められ、この遺伝子の発現がテロメラーゼ活性と相関していることを示す。

逆転反応の陽性対照として G3PDH (Glycer aldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase) 遺伝子の R T - P C R の結果を図 1 に示した。

産業上の利用可能性

5 本発明は、逆転写モチーフを有する新規遺伝子を単離し、その決定された全塩基配列を提供する。また、該遺伝子がコードするタンパク質、該タンパク質に対する抗体を提供する。

かかる塩基配列情報、タンパク質、抗体を用いることで、テロメラーゼ活性を検出する方法、癌細胞を検出する方法、さらにはテロメラーゼ活性阻害剤の開発
10 あるいはテロメラーゼ活性阻害剤のスクリーニング方法の開発に有効に用いることができる。

請求の範囲

1. 配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列を有する CRT-1 遺伝子。
2. 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子。
- 5 3. 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ逆転写酵素活性を有するタンパク質をコードする遺伝子。
4. 請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の遺伝子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ逆転写酵素活性を有するタンパク質をコードする遺伝子。
- 10 5. 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。
6. 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ逆転写酵素活性を有するタンパク質。
- 15 7. 請求項 5 又は 6 のいずれか 1 項に記載のタンパク質に対する抗体。
8. 請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の遺伝子のアンチセンス鎖の塩基配列を含むオリゴヌクレオチド。
9. 請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の遺伝子を検出することを特徴とする癌細胞検出方法。
- 20 10. 請求項 7 に記載のタンパク質に対する抗体を用いることを特徴とする癌細胞検出方法。
11. 請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドを有する逆転写酵素活性阻害剤。
12. 請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の塩基配列を含むオリゴヌク
- 25 レオチドを用いる逆転写酵素活性阻害剤のスクリーニング方法。
13. 請求項 9 又は 10 のいずれか 1 項に記載の方法を用いた癌の診断

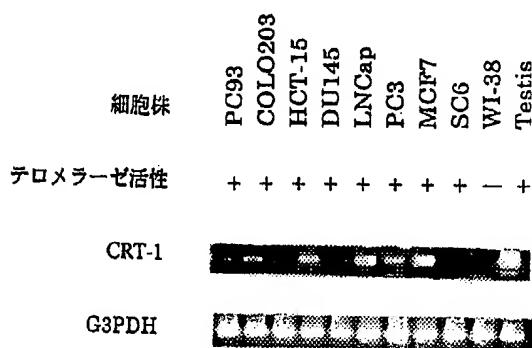
方法。

14. 請求項1～4のいずれか1項に記載の遺伝子に対して相補的なプローブを含有する癌診断薬。

15. 請求項7に記載の抗体を含有する癌診断薬。

図1

テロメラーゼ活性とCRT-1遺伝子発現の相関



配列表

SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

5 <120> A Gene having a reverse transcriptase motif

<130> CGS99-01PCT

<160> 13

10

<210> 1

<211> 1311

<212> DNA

<213> Homo sapience

15

<220>

<223>

<400> 1

20	ATG AAG ATG TGG AGA CTC ACG AGG AGG GCG GTC ATC TTG GCC CGG	45
	GTT GGC TGT GTT CCG GCC GCA GAG CAC CGT CTG CGT GAG GAG ATC	90
	CTG GCC AAG TTC CTG CAC TGG CTG ATG AGT GTG TAC GTC GTC GAG	135
	CTG CTC AGG TCT TTC TTT TAT GTC ACG GAG ACC ACG TTT CAA AAG	180
	AAC AGG CTC TTT TTC TAC CGG AAG AGT GTC TGG AGC AAG TTG CAA	225
25	AGC ATT GGA ATC AGA CAG CAC TTG AAG AGG GTG CAG CTG CGG GAG	270
	CTG TCG GAA GCA GAG GTC AGG CAG CAT CGG GAA GCC AGG CCC GCC	315
	CTG CTG ACG TCC AGA CTC CGC TTC ATC CCC AAG CCT GAC GGG CTG	360
	CGG CGG ATT GTG AAC ATG GAC TAC GTC GTG GGA GCC AGA ACG TTC	405
	CGC AGA GAA AAG AGG GCC GAG CGT CTC ACC TCG AGG GTG AAG GCA	450
30	CTG TTC AGC GTG CTC AAC TAC GAG CGG CGG CGG CCC CCC CTC	495
	CTG GGC GCC TCT GTG CTG GGC CTG GAC GAT ATC CAC AGG GCC TGG	540
	CGC ACC TTC GTG CTG CGT GTG CGG GCC CAG GAC CCG CCT GAG	585
	CTG TAC TTT GTC AAG GTG GAT GTG ACG GGC GCG TAC GAC ACC ATC	630
	CCC CAG GAC AGG CTC ACG GAG GTC ATC GCC AGC ATC ATC AAA CCC	675
35	CAG AAC ACG TAC TGC GTG CGT CGG TAT GCC GTG GTC CAG AAG GCC	720
	GCC CAT GGG CAC GTC CGC AAG GCC TTC AAG AGC CAC GTC TCT ACC	765
	TTG ACA GAC CTC CAG CGG TAC ATG CGA CAG TTC GTG GCT CAC CTG	810
	CAG GAG ACC AGC CGG CTG AGG GAT GCC GTC GTC ATC GAG CAG AGC	855
	TCC TCC CTG AAT GAG GCC AGC AGT GGC CTC TTC GAC GTC TTC CTA	900
40	CGC TTC ATG TGC CAC CAC GCC GTG CGC ATC AGG GGC AAG TCC TAC	945
	GTC CAG TGC CAG GGG ATC CGG CAG CGG TCC ATC CTC TCC ACG CTG	990
	CTC TGC AGC CTG TGC TAC GGC GAC ATG GAG AAC AAG CTG TTT GCG	1035
	GGG ATT CGG CGG GAC GGG CTG CTC CTG CGT TTG GTG GAT GAT TTC	1080
	TTG GTG ACA CCT CAC CTC ACC CAC GCG AAA ACC TTC CTC AGG ACC	1125
45	CTG GTC CGA GGT GTC CCT GAG TAT GGC TGC GTG AAC TTG CGG	1170

AAG ACA GTG GTG AAC TTC CCT GTA GAA GAC GAG GCC CTG GGT GGC 1215
 ACG GCT TTT GTT CAG ATG CCG GCC CAC GGC CTA TTC CCC TGG TGC 1260
 GGC CTG CTG CTG GAT ACC CGG ACC CTG GAG GTG CAG AGC GAC TAC 1305
 TCC AGG 1311

5

<210> 2
 <211> 437
 <212> PRT
 <213> Homo sapience

10

<220>
 <223>

<400> 2

15 Met Lys Met Trp Arg Leu Thr Arg Arg Ala Val Ile Leu Ala Arg
 5 10 15
 Val Gly Cys Val Pro Ala Ala Glu His Arg Leu Arg Glu Glu Ile
 20 25 30
 Leu Ala Lys Phe Leu His Trp Leu Met Ser Val Tyr Val Val Glu
 20 35 40 45
 Leu Leu Arg Ser Phe Phe Tyr Val Thr Glu Thr Thr Phe Gln Lys
 50 55 60
 Asn Arg Leu Phe Phe Tyr Arg Lys Ser Val Trp Ser Lys Leu Gln
 65 70 75
 25 Ser Ile Gly Ile Arg Gln His Leu Lys Arg Val Gln Leu Arg Glu
 80 85 90
 Leu Ser Glu Ala Glu Val Arg Gln His Arg Glu Ala Arg Pro Ala
 95 100 105
 Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro Lys Pro Asp Gly Leu
 30 110 115 120
 Arg Pro Ile Val Asn Met Asp Tyr Val Val Gly Ala Arg Thr Phe
 125 130 135
 Arg Arg Glu Lys Arg Ala Glu Arg Leu Thr Ser Arg Val Lys Ala
 140 145 150
 35 Leu Phe Ser Val Leu Asn Tyr Glu Arg Ala Arg Arg Pro Gly Leu
 155 160 165
 Leu Gly Ala Ser Val Leu Gly Leu Asp Asp Ile His Arg Ala Trp
 170 175 180
 Arg Thr Phe Val Leu Arg Val Arg Ala Gln Asp Pro Pro Pro Glu
 40 185 190 195
 Leu Tyr Phe Val Lys Val Asp Val Thr Gly Ala Tyr Asp Thr Ile
 200 205 210
 Pro Gln Asp Arg Leu Thr Glu Val Ile Ala Ser Ile Ile Lys Pro
 215 220 225
 45 Gln Asn Thr Tyr Cys Val Arg Arg Tyr Ala Val Val Gln Lys Ala

	230	235	240
	Ala His Gly His Val Arg Lys Ala Phe Lys Ser His Val Ser Thr		
	245	250	255
5	Leu Thr Asp Leu Gln Pro Tyr Met Arg Gln Phe Val Ala His Leu		
	260	265	270
	Gln Glu Thr Ser Pro Leu Arg Asp Ala Val Ile Glu Gln Ser		
	275	280	285
	Ser Ser Leu Asn Glu Ala Ser Ser Gly Leu Phe Asp Val Phe Leu		
	290	295	300
10	Arg Phe Met Cys His His Ala Val Arg Ile Arg Gly Lys Ser Tyr		
	305	310	315
	Val Gln Cys Gln Gly Ile Pro Gln Gly Ser Ile Leu Ser Thr Leu		
	320	325	330
	Leu Cys Ser Leu Cys Tyr Gly Asp Met Glu Asn Lys Leu Phe Ala		
15	335	340	345
	Gly Ile Arg Arg Asp Gly Leu Leu Leu Arg Leu Val Asp Asp Phe		
	350	355	360
	Leu Val Thr Pro His Leu Thr His Ala Lys Thr Phe Leu Arg Thr		
	365	370	375
20	Leu Val Arg Gly Val Pro Glu Tyr Gly Cys Val Val Asn Leu Arg		
	380	385	390
	Lys Thr Val Val Asn Phe Pro Val Glu Asp Glu Ala Leu Gly Gly		
	395	400	405
	Thr Ala Phe Val Gln Met Pro Ala His Gly Leu Phe Pro Trp Cys		
25	410	415	420
	Gly Leu Leu Leu Asp Thr Arg Thr Leu Glu Val Gln Ser Asp Tyr		
	425	430	435
	Ser Arg		
30	<210> 3		
	<211> 14		
	<212> DNA		
	<213> Artificial Sequence		
35	<220>		
	<223> probe		
	<400> 3		
	CCGCTCGTAG TTGAGCACGC TGAA 14		
40	<210> 4		
	<211> 19		
	<212> DNA		
	<213> Artificial Sequence		
45			

<220>
<223> probe

5 <400> 4
 ACCCCTTTCA AGTGCTGTC 19

10 <210> 5
 <211> 29
 <212> DNA
 10 <213> Artificial Sequence

15 <220>
 <223> probe

15 <400> 5
 TGCCTTCCT GCCGAGTGTG TGTTGATCC 29

20 <210> 6
 <211> 30
 20 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

25 <220>
 <223> probe

25 <400> 6
 TGCACAGATG AAGATGTGGA GACTCAGGAG 30

30 <210> 7
 <211> 24
 <212> DNA
 30 <213> Artificial Sequence

35 <220>
 <223> probe

35 <400> 7
 AGTTCCCTGCA CTGGCTGATG AGTG 24

40 <210> 8
 <211> 36
 <212> DNA
 40 <213> Artificial Sequence

45 <220>

<223> probe

<400> 8

AAGATGAAGT CTCACTCTGT TGCCCAGGCT GGAGTC 36

5

<210> 9

<211> 1314

<212> DNA

<213> Homo sapience

10

<220>

<223>

<400> 9

15

ATG AAG ATG TGG AGA CTC ACG AGG GCG GTC ATC TTG GCC CGG 45

GTT GGC TGT GTT CCG GCC GCA GAG CAC CGT CTG CGT GAG GAG ATC 90

CTG GCC AAG TTC CTG CAC TGG CTG ATG AGT GTG TAC GTC GTC GAG 135

CTG CTC AGG TCT TTC TTT TAT GTC ACG GAG ACC ACG TTT CAA AAG 180

AAC AGG CTC TTT TTC TAC CGG AAG AGT GTC TGG AGC AAG TTG CAA 225

20

AGC ATT GGA ATC AGA CAG CAC TTG AAG AGG GTG CAG CTG CGG GAG 270

CTG TCG GAA GCA GAG GTC AGG CAG CAT CGG GAA GCC AGG CCC GCC 315

CTG CTG ACG TCC AGA CTC CGC TTC ATC CCC AAG CCT GAC GGG CTG 360

CGG CCG ATT GTG AAC ATG GAC TAC GTC GTG GGA GCC AGA ACG TTC 405

CGC AGA GAA AAG AGG GCC GAG CGT CTC ACC TCG AGG GTG AAG GCA 450

25

CTG TTC AGC GTG CTC AAC TAC GAG CGG GCG CGG CGC CCC GGC CTC 495

CTG GGC GCC TCT GTG CTG GGC CTG GAC GAT ATC CAC AGG GCC TGG 540

CGC ACC TTC GTG CTG CGT GTG CGG GCC CAG GAC CCG CCT GAG 585

CTG TAC TTT GTC AAG GTG GAT GTG ACG GGC GCG TAC GAC ACC ATC 630

CCC CAG GAC AGG CTC ACG GAG GTC ATC GCC AGC ATC ATC AAA CCC 675

30

CAG AAC ACG TAC TGC GTG CGT CGG TAT GCC GTG GTC CAG AAG GCC 720

GCC CAT GGG CAC GTC CGC AAG GCC TTC AAG AGC CAC GTC TCT ACC 765

TTG ACA GAC CTC CAG CCG TAC ATG CGA CAG TTC GTG GCT CAC CTG 810

CAG GAG ACC AGC CCG CTG AGG GAT GCC GTC GTC ATC GAG CAG AGC 855

TCC TCC CTG AAT GAG GCC AGC AGT GGC CTC TTC GAC GTC TTC CTA 900

35

CGC TTC ATG TGC CAC CAC GCC GTG CGC ATC AGG GGC AAG TCC TAC 945

GTC CAG TGC CAG GGG ATC CCG CAG GGC TCC ATC CTC TCC ACG CTG 990

CTC TGC AGC CTG TGC TAC GGC GAC ATG GAG AAC AAG CTG TTT GCG 1035

GGG ATT CGG CGG GAC GGG CTG CTC CTG CGT TTG GTG GAT GAT TTC 1080

TTG TTG GTG ACA CCT CAC CTC ACC CAC GCG AAA ACC TTC CTC AGG 1125

40

ACC CTG GTC CGA GGT GTC CCT GAG TAT GGC TGC GTG GTG AAC TTG 1170

CGG AAG ACA GTG GTG AAC TTC CCT GTA GAA GAC GAG GGC CTG GGT 1215

GGC ACG GCT TTT GTT CAG ATG CCG GCC CAC GGC CTA TTC CCC TGG 1260

TGC GGC CTG CTG CTG GAT ACC CGG ACC CTG GAG GTG CAG AGC GAC 1305

TAC TCC AGG

1314

45

<210> 10
<211> 438
<212> PRT
<213> Homo sapience

5

<220>

<400> 10

10	Met Lys Met Trp Arg Leu Thr Arg Arg Ala Val Ile Leu Ala Arg	5	10	15
	Val Gly Cys Val Pro Ala Ala Glu His Arg Leu Arg Glu Glu Ile	20	25	30
15	Leu Ala Lys Phe Leu His Trp Leu Met Ser Val Tyr Val Val Glu	35	40	45
	Leu Leu Arg Ser Phe Phe Tyr Val Thr Glu Thr Thr Phe Gln Lys	50	55	60
	Asn Arg Leu Phe Phe Tyr Arg Lys Ser Val Trp Ser Lys Leu Gln	65	70	75
20	Ser Ile Gly Ile Arg Gln His Leu Lys Arg Val Gln Leu Arg Glu	80	85	90
	Leu Ser Glu Ala Glu Val Arg Gln His Arg Glu Ala Arg Pro Ala	95	100	105
25	Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro Lys Pro Asp Gly Leu	110	115	120
	Arg Pro Ile Val Asn Met Asp Tyr Val Val Gly Ala Arg Thr Phe	125	130	135
	Arg Arg Glu Lys Arg Ala Glu Arg Leu Thr Ser Arg Val Lys Ala	140	145	150
30	Leu Phe Ser Val Leu Asn Tyr Glu Arg Ala Arg Arg Pro Gly Leu	155	160	165
	Leu Gly Ala Ser Val Leu Gly Leu Asp Asp Ile His Arg Ala Trp	170	175	180
35	Arg Thr Phe Val Leu Arg Val Arg Ala Gln Asp Pro Pro Pro Glu	185	190	195
	Leu Tyr Phe Val Lys Val Asp Val Thr Gly Ala Tyr Asp Thr Ile	200	205	210
	Pro Gln Asp Arg Leu Thr Glu Val Ile Ala Ser Ile Ile Lys Pro	215	220	225
40	Gln Asn Thr Tyr Cys Val Arg Arg Tyr Ala Val Val Gln Lys Ala	230	235	240
	Ala His Gly His Val Arg Lys Ala Phe Lys Ser His Val Ser Thr	245	250	255
45	Leu Thr Asp Leu Gln Pro Tyr Met Arg Gln Phe Val Ala His Leu	260	265	270

Gln Glu Thr Ser Pro Leu Arg Asp Ala Val Val Ile Glu Gln Ser
 275 280 285
 Ser Ser Leu Asn Glu Ala Ser Ser Gly Leu Phe Asp Val Phe Leu
 290 295 300
 5 Arg Phe Met Cys His His Ala Val Arg Ile Arg Gly Lys Ser Tyr
 305 310 315
 Val Gln Cys Gln Gly Ile Pro Gln Gly Ser Ile Leu Ser Thr Leu
 320 325 330
 Leu Cys Ser Leu Cys Tyr Gly Asp Met Glu Asn Lys Leu Phe Ala
 10 335 340 345
 Gly Ile Arg Arg Asp Gly Leu Leu Arg Leu Val Asp Asp Phe
 350 355 360
 Leu Leu Val Thr Pro His Leu Thr His Ala Lys Thr Phe Leu Arg
 365 370 375
 15 Thr Leu Val Arg Gly Val Pro Glu Tyr Gly Cys Val Val Asn Leu
 380 385 390
 Arg Lys Thr Val Val Asn Phe Pro Val Glu Asp Glu Ala Leu Gly
 395 400 405
 Gly Thr Ala Phe Val Gln Met Pro Ala His Gly Leu Phe Pro Trp
 20 410 415 420
 Cys Gly Leu Leu Leu Asp Thr Arg Thr Leu Glu Val Gln Ser Asp
 425 430 435
 Tyr Ser Arg
 438
 25
 <210> 11
 <211> 1866
 <212> DNA
 <213> Homo sapience
 30
 <220>
 <223>
 <400> 11
 35 ATG AAG ATG TGG AGA CTC ACG AGG AGG GCG GTC ATC TTG GCC CGG 45
 GTT GGC TGT GTT CCG GCC GCA GAG CAC CGT CTG CGT GAG GAG ATC 90
 CTG GCC AAG TTC CTG CAC TGG CTG ATG AGT GTG TAC GTC GTC GAG 135
 CTG CTC AGG TCT TTC TTT TAT GTC ACG GAG ACC ACG TTT CAA AAG 180
 AAC AGG CTC TTT TTC TAC CGG AAG AGT GTC TGG AGC AAG TTG CAA 225
 40 AGC ATT GGA ATC AGA CAG CAC TTG AAG AGG GTG CAG CTG CGG GAG 270
 CTG TCG GAA GCA GAG GTC AGG CAG CAT CGG GAA GCC AGG CCC GCC 315
 CTG CTG ACG TCC AGA CTC CGC TTC ATC CCC AAG CCT GAC GGG CTG 360
 CGG CGG ATT GTG AAC ATG GAC TAC GTC GTG GGA GCC AGA ACG TTC 405
 CGC AGA GAA AAG AGG GCC GAG CGT CTC ACC TCG AGG GTG AAG GCA 450
 45 CTG TTC AGC GTG CTC AAC TAC GAG CGG GCG CGG CGC CCC GGC CTC 495

CTG GCC GCC TCT GTG CGC CTG GAC GAT ATC CAC AGG GCC TGG 540
 CGC ACC TTC GTG CTG CGT GTG CGG GCC CAG GAC CCG CCT GAG 585
 CTG TAC TTT GTC AAG GTG GAT GTG ACG GGC GCG TAC GAC ACC ATC 630
 CCC CAG GAC AGG CTC ACG GAG GTC ATC GCC AGC ATC ATC AAA CCC 675
 5 CAG AAC ACG TAC TGC GTG CGT CGG TAT GCC GTG GTC CAG AAG GCC 720
 GCC CAT GGG CAC GTC CGC AAG GCC TTC AAG AGC CAC GTC TCT ACC 765
 TTG ACA GAC CTC CAG CCG TAC ATG CGA CAG TTC GTG GCT CAC CTG 810
 CAG GAG ACC AGC CCG CTG AGG GAT GCC GTC GTC ATC GAG CAG AGC 855
 TCC TCC CTG AAT GAG GCC AGC AGT GGC CTC TTC GAC GTC TTC CTA 900
 10 CGC TTC ATG TGC CAC CAC GCC GTG CGC ATC AGG GGC AAG TCC TAC 945
 GTC CAG TGC CAG GGG ATC CCG CAG GGC TCC ATC CTC TCC ACG CTG 990
 CTC TGC AGC CTG TGC TAC GGC GAC ATG GAG AAC AAG CTG TTT GCG 1035
 GGG ATT CGG CGG GAC GGG CTG CTC CTG CGT TTG GTG GAT GAT TTC 1080
 TTG TTG GTG ACA CCT CAC CTC ACC CAC GCG AAA ACC TTC CTC AGG 1125
 15 ACC CTG GTC CGA GGT GTC CCT GAG TAT GGC TGC GTG GTG AAC TTG 1170
 CGG AAG ACA GTG GTG AAC TTC CCT GTA GAA GAC GAG GCC CTG GGT 1215
 GGC ACG GCT TTT GTT CAG ATG CCG GCC CAC GGC CTA TTC CCC TGG 1260
 TGC GGC CTG CTG CTG GAT ACC CCG ACC CTG GAG GTG CAG AGC GAC 1305
 TAC TCC AGC TAT GCC CGG ACC TCC ATC AGA GCC AGT CTC ACC TTC 1350
 20 AAC CGC GGC TTC AAG GCT GGG AGG AAC ATG CGT CGC AAA CTC TTT 1395
 GGG GTC TTG CGG CTG AAG TGT CAC AGC CTG TTT CTG GAT TTG CAG 1440
 GTG AAC AGC CTC CAG ACG GTG TGC ACC AAC ATC TAC AAG ATC CTC 1485
 CTG CTG CAG GCG TAC AGG TTT CAC GCA TGT GTG CTG CAG CTC CCA 1530
 TTT CAT CAG CAA GTT TGG AAG AAC CCC ACA TTT TTC CTG CGC GTC 1575
 25 ATC TCT GAC ACG GCC TCC CTC TGC TAC TCC ATC CTG AAA GCC AAG 1620
 AAC GCA GGG ATG TCG CTG GGG GCC AAG GGC GCC GGC CCT CTG 1665
 CCC TCC GAG GCC GTG CAG TGG CTG TGC CAC CAA GCA TTC CTG CTC 1710
 AAG CTG ACT CGA CAC CGT GTC ACC TAC GTG CCA CTC CTG GGG TCA 1755
 CTC AGG ACA GCC CAG ACG CAG CTG AGT CGG AAG CTC CCG GGG AGC 1800
 30 ACG CTG ACT GCC CTG GAG GCC GCA AAC CCG GCA CTG CCC TCA 1845
 GAC TTC AAG ACC ATC CTG GAC 1866

<210> 12

<211> 622

35 <212> PRT

<213> Homo sapience

<220>

<223>

40 <400> 12

Met Lys Met Trp Arg Leu Thr Arg Arg Ala Val Ile Leu Ala Arg

5

10

15

Val Gly Cys Val Pro Ala Ala Glu His Arg Leu Arg Glu Glu Ile

45

20

25

30

Leu Ala Lys Phe Leu His Trp Leu Met Ser Val Tyr Val Val Glu
 35 40 45
 Leu Leu Arg Ser Phe Phe Tyr Val Thr Glu Thr Thr Phe Gln Lys
 50 55 60
 5 Asn Arg Leu Phe Phe Tyr Arg Lys Ser Val Trp Ser Lys Leu Gln
 65 70 75
 Ser Ile Gly Ile Arg Gln His Leu Lys Arg Val Gln Leu Arg Glu
 80 85 90
 Leu Ser Glu Ala Glu Val Arg Gln His Arg Glu Ala Arg Pro Ala
 10 95 100 105
 Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro Lys Pro Asp Gly Leu
 110 115 120
 Arg Pro Ile Val Asn Met Asp Tyr Val Val Gly Ala Arg Thr Phe
 125 130 135
 15 Arg Arg Glu Lys Arg Ala Glu Arg Leu Thr Ser Arg Val Lys Ala
 140 145 150
 Leu Phe Ser Val Leu Asn Tyr Glu Arg Ala Arg Arg Pro Gly Leu
 155 160 165
 Leu Gly Ala Ser Val Leu Gly Leu Asp Asp Ile His Arg Ala Trp
 20 170 175 180
 Arg Thr Phe Val Leu Arg Val Arg Ala Gln Asp Pro Pro Pro Glu
 185 190 195
 Leu Tyr Phe Val Lys Val Asp Val Thr Gly Ala Tyr Asp Thr Ile
 200 205 210
 25 Pro Gln Asp Arg Leu Thr Glu Val Ile Ala Ser Ile Ile Lys Pro
 215 220 225
 Gln Asn Thr Tyr Cys Val Arg Arg Tyr Ala Val Val Gln Lys Ala
 230 235 240
 Ala His Gly His Val Arg Lys Ala Phe Lys Ser His Val Ser Thr
 30 245 250 255
 Leu Thr Asp Leu Gln Pro Tyr Met Arg Gln Phe Val Ala His Leu
 260 265 270
 Gln Glu Thr Ser Pro Leu Arg Asp Ala Val Val Ile Glu Gln Ser
 275 280 285
 35 Ser Ser Leu Asn Glu Ala Ser Ser Gly Leu Phe Asp Val Phe Leu
 290 295 300
 Arg Phe Met Cys His His Ala Val Arg Ile Arg Gly Lys Ser Tyr
 305 310 315
 Val Gln Cys Gln Gly Ile Pro Gln Gly Ser Ile Leu Ser Thr Leu
 40 320 325 330
 Leu Cys Ser Leu Cys Tyr Gly Asp Met Glu Asn Lys Leu Phe Ala
 335 340 345
 Gly Ile Arg Arg Asp Gly Leu Leu Leu Arg Leu Val Asp Asp Phe
 350 355 360
 45 Leu Leu Val Thr Pro His Leu Thr His Ala Lys Thr Phe Leu Arg

	365	370	375
	Thr Leu Val Arg Gly Val Pro Glu Tyr Gly Cys Val Val Asn Leu		
	380	385	390
5	Arg Lys Thr Val Val Asn Phe Pro Val Glu Asp Glu Ala Leu Gly		
	395	400	405
	Gly Thr Ala Phe Val Gln Met Pro Ala His Gly Leu Phe Pro Trp		
	410	415	420
	Cys Gly Leu Leu Leu Asp Thr Arg Thr Leu Glu Val Gln Ser Asp		
	425	430	435
10	Tyr Ser Ser Tyr Ala Arg Thr Ser Ile Arg Ala Ser Leu Thr Phe		
	440	445	450
	Asn Arg Gly Phe Lys Ala Gly Arg Asn Met Arg Arg Lys Leu Phe		
	455	460	465
	Gly Val Leu Arg Leu Lys Cys His Ser Leu Phe Leu Asp Leu Gln		
15	470	475	480
	Val Asn Ser Leu Gln Thr Val Cys Thr Asn Ile Tyr Lys Ile Leu		
	485	490	495
	Leu Leu Gln Ala Tyr Arg Phe His Ala Cys Val Leu Gln Leu Pro		
	500	505	510
20	Phe His Gln Gln Val Trp Lys Asn Pro Thr Phe Phe Leu Arg Val		
	515	520	525
	Ile Ser Asp Thr Ala Ser Leu Cys Tyr Ser Ile Leu Lys Ala Lys		
	530	535	540
	Asn Ala Gly Met Ser Leu Gly Ala Lys Gly Ala Ala Gly Pro Leu		
25	545	550	555
	Pro Ser Glu Ala Val Gln Trp Leu Cys His Gln Ala Phe Leu Leu		
	560	565	570
	Lys Leu Thr Arg His Arg Val Thr Tyr Val Pro Leu Leu Gly Ser		
	575	580	585
30	Leu Arg Thr Ala Gln Thr Gln Leu Ser Arg Lys Leu Pro Gly Thr		
	590	595	600
	Thr Leu Thr Ala Leu Glu Ala Ala Ala Asn Pro Ala Leu Pro Ser		
	605	610	615
	Asp Phe Lys Thr Ile Leu Asp		
35	620	622	
	<210> 13		
	<211> 37		
	<212> DNA		
40	<213> Artificial Sequence		
	<220>		
	<223> probe		
45	<400> 13		

WO 99/35261

PCT/JP99/00039

CTGAAAAACT CATATATTCA GTATTTACT CCCACAG 37

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/00039

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁶ C12N15/12, C12P21/02, C12Q1/68, C07K16/40

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁶ C12N15/12, C12P21/02, C12Q1/68, C07K16/40

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI (DIALOG), GenBank/EMBL/DDBJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Toru M. Nakamura, et al., "Telomerase Catalytic Subunit Homologs from Fission Yeast and Human", SCIENCE (1997), Vol. 277, p.955-959	1-12 14, 15
Y	Matthew Meyerson, et al., "hEST2, the Putative Human Telomerase Catalytic Subunit Gene, Is Up-Regulated in Tumor Cells and during Immortalization", Cell (1997), Vol. 90, p.785-795	1-12 14, 15

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E"	earlier document but published on or after the international filing date
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&"	document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 19 April, 1999 (19. 04. 99)	Date of mailing of the international search report 27 April, 1999 (27. 04. 99)
------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
----------------------------------------------------------------	--------------------

Facsimile No.	Telephone No.
---------------	---------------

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/00039

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 13

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 13 pertains to diagnostic methods of the human body and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulation under the PCT, to search.

2. Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP99/00039

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. C1° C12N15/12, C12P21/02, C12Q1/68, C07K16/40

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. C1° C12N15/12, C12P21/02, C12Q1/68, C07K16/40

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG)

GenBank/EMBL/DDBJ

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリーエ	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Toru M. Nakamura, et al., 「Telomerase Catalytic Subunit Homologs from Fission Yeast and Human」, SCIENCE(1997), 第277巻, p. 955-959	1-12 14, 15
Y	Matthew Meyerson, et al., 「hEST2, the Putative Human Telomerase Catalytic Subunit Gene, Is Up-Regulated in Tumor Cells and during Immortalization」, Cell(1997), 第90巻, p. 785-795	1-12 14, 15

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示す
もの「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日
以後に公表されたもの「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行
日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する
文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって
て出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理
論の理解のために引用するもの「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明
の新規性又は進歩性がないと考えられるもの「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以
上の文献との、当業者にとって自明である組合せに
よって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

19.04.99

国際調査報告の発送日

27.04.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

富永 みどり

4N

9839

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 13 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

請求項13は、人体の診断方法に該当するものであるから、PCT17条(2)(a)及びPCT規則39(iv)の規定により、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。

2. 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。

2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。

追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。